



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 7/06, 5/08, 5/10, A61K 38/04	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/18235 (43) Date de publication internationale: 22 mai 1997 (22.05.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01811 (22) Date de dépôt international: 15 novembre 1996 (15.11.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/13543 15 novembre 1995 (15.11.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIETE D'ETUDE ET DE RECHERCHE DE PATHOLOGIE APPLIQUEE - SERPA (FR/FR); Villa Missouri - Tech Village 2, 18, avenue de l'Europe, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUSSOURD D'HINTERLAND, Lucien (FR/FR); 10, rue Pierre-Benoît, F-31400 Toulouse (FR). PINEL, Anne-Marie (FR/FR); 771, rue des Navigateurs, F-34280 La Grande-Motte (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requies.</i>
(54) Title: PEPTIDE CONJUGATES, USE THEREOF AS A DRUG, AND COMPOSITIONS CONTAINING SAME		
(54) Titre: CONJUGUES PEPTIDIQUES, LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT ET COMPOSITIONS LES CONTENANT		
(57) Abstract <p>Peptide conjugates including a sequence of at least three amino acids selected from Lys-Lys-Gly, Gly-His-Lys and Glu-His-Lys, wherein "Lys" is Lysine or a halogenated derivative thereof, or a methylated Lysine derivative, particularly Methyl-Lysine and Dihydrobromo-Methyl-Lysine, said amino acids optionally being in D, L or DL form, and said sequence being chemically or physically conjugated with at least one compound selected from monocarboxylic acids of general formula (I): HOOC-R, or alcohol, aldehyde or amide derivatives thereof, and dicarboxylic acids of general formula (II): HOOC-R₁-COOH, are disclosed. The use of such conjugates as a drug, and pharmaceutical or cosmetic compositions containing said conjugates, are also disclosed.</p>		
(57) Abrégé <p>L'invention concerne des conjugués peptidiques comprenant une séquence d'au moins 3 acides aminés choisis parmi Lys-Lys-Gly, Gly-His-Lys et Glu-His-Lys, dans laquelle "Lys" représente la Lysine ou un dérivé halogéné de la Lysine, ou un dérivé méthylé de la Lysine, notamment Méthyl-Lysine et Dihydrobromo-Méthyl-Lysine, les acides aminés pouvant être sous la forme D, L ou DL; ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi les acides monocarboxyliques de formule générale (I): HOOC-R, ainsi que leurs dérivés alcool, aldéhyde ou amide; les acides dicarboxyliques de formule générale (II): HOOC-R₁-COOH. Elle concerne également leur utilisation à titre de médicament et des compositions pharmaceutiques ou cosmétologiques les contenant.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldovie	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

CONJUGUES PEPTIDIQUES, LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT ET COMPOSITIONS LES CONTENANT

Sous l'influence de processus physiologiques internes "peptides neurotransmetteurs" ou externes "radiations ionisantes et ultraviolettes",
5 les cellules de l'épiderme, en particulier les kératinocytes germinatifs sécrètent des facteurs de croissance et de coopération cellulaire, dont le rôle est de stimuler les synthèses cellulaires des molécules du cytosquelette et d'activer les interactions cellulaires.

Ces propriétés physiologiques se traduisent par une activation des
10 métabolismes cellulaires indispensables à la régénération des tissus conjonctifs du derme et de l'épiderme et des processus de cicatrisation.

La présente invention a pour objet la réalisation de molécules peptidiques, dérivés homologues des séquences peptidiques actives des
15 facteurs de croissance et de coopération cellulaires, sécrétés naturellement par les kératinocytes.

Parmi les dérivés peptidiques faisant l'objet de la présente invention figurent notamment des dérivés peptidiques et métallo-peptidiques dont les activités pharmacologiques sont orientées :
- d'une part, vers les synthèses cellulaires des molécules composant le
20 cytosquelette telles que les collagènes de type I et III, les glycosaminoglycanes, les fibronectines,
- d'autre part, vers la synthèse des molécules dont le rôle est de stimuler et d'activer les phénomènes de coopération et d'interaction cellulaire "endothélines, intégrines".

25 Ces activités étant complémentaires et indispensables à l'expression au niveau du derme et de l'épiderme, des processus de restructuration des tissus, cicatrisation, angiogénèse, mélanogénèse, etc...

Un des objets de la présente invention est l'utilisation des dérivés peptidiques et métallo-peptidiques précédents, pour le traitement en
30 application par voie topique, de la cicatrisation des plaies chroniques, telles que les lésions ulcéreuses du diabétique, les ulcères variqueux, la cicatrisation esthétique des plaies chirurgicales, le traitement préventif et curatif des vergetures et de leurs complications.

Dans les indications précédentes, les dérivés peptidiques peuvent
35 être utilisés en thérapeutique humaine et vétérinaire sous forme de "pommades, gels, solutions ou de spray".

Une des applications privilégiée de l'invention est l'utilisation des dérivés peptidiques dans les différents domaines de la cosmétologie, pour le traitement préventif et curatif des rides, du visage, du cou, et des mains, sous forme de lotions, gels, laits, crèmes, ou de spray, en application locale.

- 5 Une autre application des dérivés peptidiques de l'invention est leur utilisation comme agent d'activation et de potentialisation des mécanismes physiologiques de coopérations cellulaires.

- 10 Les dérivés peptidiques peuvent être utilisés seuls ou de préférence en association, avec des biomolécules ou composés naturels ou leurs dérivés de synthèse, dont l'activité biologique spécifique, ne peut s'exprimer pleinement, que par la collaboration entre deux systèmes cellulaires complémentaires dont ils stimulent ou induisent qu'un seul élément.

- 15 C'est le cas, en particulier, des hormones mélanotropes qui induisent la mélanogénèse dans les cellules mélanocytaires et dont l'expression au niveau de la surface de l'épiderme humain (race blanche) ne peut s'exprimer pleinement que par l'intime coopération entre les cellules mélanocytaires et les kératinocytes, formant ainsi une véritable unité fonctionnelle dénommée "Epidermal Melanin Unit".

- 20 Les mélanocytes activés par l' α MSH et ses dérivés sécrètent la mélanine, qui est transférée et dispersée, dans les kératinocytes, sous l'influence des facteurs peptidiques de coopération cellulaire et de leurs dérivés homologues.

- 25 Une des applications de la présente invention est l'utilisation des dérivés peptidiques, précédemment décrits, dans les différents domaines de la dermatologie et de la cosmétologie.

- 30 Les dérivés peptidiques peuvent être utilisés seuls ou en association avec d'autres molécules actives, tels que les dérivés homologues de synthèse de l' α MSH, ou autres substances, sous la forme de crèmes, laits, lotions, solutions ou sprays, en applications topiques (locales), pour l'accélération des processus de mélanogénèse de l'épiderme, accélération de la mélanisation de la peau par obtention d'un bronzage naturel et d'une protection totale contre les radiations solaires (UV).

Plus particulièrement la présente invention concerne des conjugués comportant une séquence peptidique comprenant au moins trois acides aminés choisis parmi Lys-Lys-Gly, Gly-His-Lys et Glu-His-Lys, dans laquelle "Lys" représente la Lysine ou un dérivé halogéné de la Lysine, ou un dérivé méthylé de la Lysine, notamment Méthyl-Lysine et Dihydrobromo-Méthyl-Lysine, les acides aminés pouvant être sous la forme D, L ou DL

Ces acides aminés étant sous leur forme naturelle ou non, ladite séquence étant utilisée sous forme peptidique, ou conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi

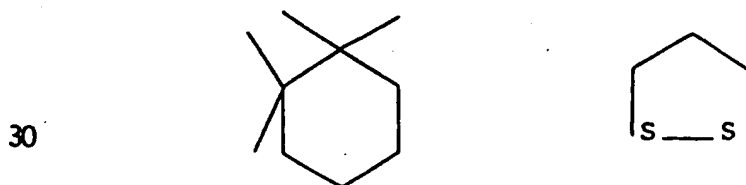
1) les acides monocarboxyliques de formule générale



dans laquelle R représente un radical aliphatique en C_1 à C_{20} droit ou ramifié, substitué ou non, notamment un radical alkyl, alkényl ou alkynyl pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux choisis dans le groupe comprenant : NH_2 , OH, oxo ou un radical cyclique non aromatique comportant de 5 à 6 atomes dans le cycle dont 1 ou 2 pouvant être différents du carbone, en particulier, S, O ou N, lesdits cycles pouvant être substitués par des radicaux alkyl en C_1 à C_3 , notamment méthyl,

ainsi que les dérivés alcool ou aldéhyde ou amide des acides de formule I ; à la condition que si la séquence peptidique comprend uniquement Gly-His-Lys, elle n'est pas conjuguée à un seul résidu d'acide palmitique ;

Parmi les cycles pouvant être substitués, il faut citer les cycles



correspondant à des dérivés de l'acide rétinoïque et de l'acide lipoïque.

Dans certains cas, la chaîne aliphatique peut consister en une chaîne polyalkényl.

Parmi les composés de formule I il faut citer de préférence les composés de formule :



de configuration cis ou trans dans laquelle R_2 est un radical alkyl en C_6 à C_{16} , comportant éventuellement un ou plusieurs substituants $-NH_2$, OH ou oxo.

2) les acides dicarboxyliques de formule générale



dans laquelle R_1 représente un radical aliphatique divalent notamment en C_3 à C_{10} , droit ou ramifié, substitué ou non, notamment un radical alkyl, alkylène, alkénylène ou alkynylène, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux NH_2 , OH, oxo ou un radical alkyl en C_1 à C_3 .

Dans la formule générale I, il faut citer plus particulièrement les composés dans lesquels R représente :

- un radical monoinsaturé de configuration cis ou trans, de formule générale



dans laquelle R_2 représente un radical aliphatique notamment alkyl, linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence 6 à 16 atomes de carbone, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo ;

25 - un radical alkyl linéaire ou ramifié en C_1-C_{20} éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi : amino, hydroxy, oxo, thiol, imino, cycloalkyl en C_4-C_7 , éventuellement substitué et si au moins 2 substituants sont présents, ils peuvent former ensemble une liaison, notamment un pont disulfure.

30 Les peptides conjugués selon l'invention sont liés sous forme de sels, d'esters, ou d'amides à des acides possédant des fonctions métaboliques essentielles dans l'activation du cycle tricarboxylique de Krebs.

Les acides de formule générale (I) ou (II) sont plus particulièrement choisis parmi les acides carboxyliques pour lesquels R_1 représente un alkylène en C_4 - C_8 substitué ou non, en particulier, les acides acétiques, adipiques, α -amino-adipiques et dérivés, l'acide DL lipoïque et dérivés, l'acide dihydrolipoïque et son dérivé N-Lipoyl-Lysine, l'acide pimélique et dérivés, l'acide sébacique et dérivés.

Les acides gras pour lesquels R représente un reste alkylène linéaire ou ramifié, sont plus particulièrement les acides hydroxydécénoïques et décénoïques, les acides rétinoïques et ses dérivés, le Rétinal et le Rétinol, l'acide myristique et ses dérivés, et l'acide palmitique, sous forme de sels d'esters, ou d'amides.

Des composés spécialement adaptés à l'obtention de conjugués selon l'invention sont choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide α -DL-Lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque, la N-Lipoyl-Lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et ses dérivés, l'acide trans-10-hydroxy- Δ^2 -décénoïque et l'acide trans-oxo-9-decene-2-oïque, l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol, et le rétinol, l'acide myristique et l'acide palmitique.

Plus spécifiquement, la présente invention concerne des peptides inducteurs des synthèses endocellulaires des collagènes de type I et III et des glycosaminoglycanes, à haute activité cicatrisante et métabolique, ainsi que des molécules d'induction et de stimulation des processus de coopération cellulaire.

Les conjugués peptidiques selon l'invention comprennent de préférence au moins une des séquences peptidiques suivantes :

Lys-Lys-Gly

Gly-His-Lys

Glu-His-Lys

dans laquelle Lys représente la lysine ou un dérivé halogéné de la lysine, ou un dérivé méthylé de la lysine, notamment Méthyl-Lysine et Dihydrobromo-Méthyl-Lysine, les acides aminés pouvant être sous la forme D, L ou DL

De préférence, les conjugués peptidiques répondent à l'une des formules générales suivantes :

A-X-Gly-His-Lys-Y (III), ou

A-X-Glu-His-Lys-Y (IV)

5 dans laquelle . A est un composé de formule générale I ou II ou le radical correspondant à ce composé

. X peut représenter une chaîne de 1 à 3 résidus Lys, éventuellement méthylée, en particulier à l'extrémité N terminale, OH, NH₂ ou une liaison

10 . Y peut représenter OH ou NH₂,

les acides aminés étant sous forme D, L ou DL

A est de préférence l'acide acétique, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide DL lipoïque, l'acide dihydrolipoïque, la N-Lipoyl-Lysine, l'acide pimélique, l'acide sébacique, l'acide 15 trans-oxo-9-décène-2 oïque et l'acide trans-hydroxy-10-décène-2-oïque.

La présente invention concerne particulièrement les conjugués peptidiques suivants :

- 1 - A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 20 2 - A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 3 - A-MeLys-Gly-His-Lys-NH₂
- 4 - A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 5 - A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 6 - A-MeLys-Gly-His-Lys-OH
- 25 7 - A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 8 - A-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 9 - A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 10 - A-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 11 - A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-NH₂
- 30 12 - A-Lys-Glu-His-Lys-NH₂

- 13 - A-Glu-His-Lys-NH₂
- 14 - A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 15 - A-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 16 - A-Glu-His-Lys-OH

5

A étant défini comme précédemment, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters, ou d'amides.

Les séquences d'acides aminés, mentionnés ci-dessus peuvent être des séquences d'acides aminés naturels ou non naturels.

- 10 Les conjugaisons selon la présente invention peuvent être effectués en faisant réagir la fonction amine ou acide de l'acide aminé avec une fonction amine ou acide de l'acide A, ou même il est possible de mettre à profit la présence d'une fonction hydroxy sur l'acide.

- 15 La présente invention concerne l'ensemble de ces conjugaisons ainsi que les conjugués non fonctionnels.

Les conjugués peptidiques précédemment décrits dans l'invention, peuvent être utilisés sous leur forme peptidique, ou liés avec un métal sous forme de complexes équimoléculaires.

- 20 Le métal utilisé pour la réalisation des complexes métallo-peptidiques de l'invention est de préférence un métal divalent notamment le Zinc (Zn), qui peut être couplé sous forme de sel, avec le groupement carboxylique de l'acide-amino terminal, la lysine (Lys).

De même, dans certains cas, il est possible que certains amino-acides comportent par exemple des fonctions de glycosylation.

- 25 Il doit être entendu que la présente invention concerne également l'ensemble de ces formes.

- 30 Selon un autre aspect, l'invention concerne des compositions galéniques contenant au moins un conjugué peptidique tel que défini précédemment, avec des excipients cosmétologiquement et/ou pharmaceutiquement acceptables.

La présente invention concerne plus particulièrement l'utilisation à titre de médicament d'un, ou plusieurs des conjugués et dérivés peptidiques décrits précédemment selon l'invention.

La présente invention concerne également des préparations cosmétiques, contenant un, ou plusieurs conjugués et dérivés peptidiques décrits précédemment selon l'invention.

5 La présente invention concerne également des compositions galéniques, pharmaceutiques et cosmétologiques, comprenant au moins un des composés tels que défini précédemment.

Un des objets de la présente invention est l'utilisation par voie topique ou injectable des conjugués peptidiques et de leurs dérivés, composition ou association avec des principes actifs connus.

10 Ces conjugués peptidiques, leurs dérivés, composition ou association, peuvent être présentés sous forme d'ampoules injectables lyophilisées, et sous forme de crème, gels, laits, lotions ou sprays, et comporter des excipients connus.

15 Les conjugués peptidiques de l'invention, leurs dérivés, compositions, ou associations avec des principes actifs connus, sont utiles pour le traitement et la cicatrisation des plaies et lésions chroniques du diabétique, les ulcères variqueux, la cicatrisation des plaies chirurgicales, le traitement préventif et curatif des vergetures.

20 Le conjugué pourra notamment être associé à au moins une substance choisie parmi les antiseptiques, les antibiotiques à large spectre antimicrobien, ou les antifongiques à large spectre d'activité, pour la préparation d'une composition destinée au traitement par voie topique et à la cicatrisation des plaies infectées.

25 Selon un autre aspect, le conjugué peptidique peut être présenté sous forme d'associations ou de composés, avec des molécules connues pour leurs activités anticoagulantes et phlébotoniques par voie topique, destinées au traitement préventif et curatif, des vergetures, des insuffisances veineuses (jambes lourdes), de la couperose, en applications locales, sous forme de crèmes de gels, de laits ou de sprays.

30 Une des applications préférentielle de l'invention est l'utilisation des conjugués peptidiques, comme adjuvants, activateurs ou cofacteurs, en association avec des molécules choisies parmi l' α MSH ou ses dérivés homologues, l'ACTH ou la propiomélanocortine et leurs analogues dans des

compositions destinées au traitement préventif et curatif des troubles de la mélanogénèse, à la stimulation de la mélanogénèse épidermique, en vue de l'obtention d'un bronzage naturel rapide et d'une protection totale contre les radiations solaires ultraviolettes (DEM).

5 Une autre des applications préférentielles de l'invention est l'utilisation des conjugués peptidiques dans les différentes formulations cosmétologiques pour le traitement préventif et curatif des rides, du visage, du cou et des mains, sous forme d'émulsions, de crèmes, de laits, de lotions, de gels, ou de sprays en application locale.

10 Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples on se référera aux Figures suivantes :

Figure 1 : Intensité de fluorescence de fibroblastes marqués à la rhodamine : mise en évidence du collagène de type I.

15 Figures 2 et 3 : Mise en évidence par mesure de l'intensité de coloration de la synthèse de collagène par des cellules traitées ou non par le conjugué n° 7.

Exemple n° 1 - Synthèse du conjugué 7

20

A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

A = Acide Adipique = COOH-(CH₂)₄-COOH

25

La synthèse a été réalisée par la méthode de Merrifield adaptée à la structure du conjugué selon les étapes suivantes :

Z-Gly-His-Lys-NH₂ :

30

A une solution dans la diméthylformamide (10 mL) contenant Z-Gly-OH (2.08 g, 10 mmoles), BOP (4.42 g, 10 mmoles), de la diisopropyléthylamine (DIEA, 22 mmoles) est additionné sous agitation et à 0° C, le chlorhydrate de H-His-Lys-NH₂ (2.1 g, 11 mmoles).

- 5 Après 6 heures d'agitation à la température ambiante, le solvant de la réaction est évaporé sous vide à une température inférieure à 40° C.

Le résidu est dissout dans de l'acétate d'éthyle (200 mL).

- La phase organique est lavée plusieurs fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL), avec une
10 solution saturée de KHSO₄ (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL).

La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide pour conduire à une mousse blanche (3.1 g, 91%) homogène en chromatographie sur gel de silice.

- 15 Z-Lys(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂

Le composé Z-Gly-His-Lys-NH₂ (3.45 g, 10 mmoles) est dissout dans l'éthanol 95 (100 mL) contenant 20 mmoles d'acide chlorhydrique.

Le mélange réactionnel est hydrogéné pendant 5 heures.

- 20 Le catalyseur est filtré et le solvant concentré sous vide à une température inférieure à 40° C.

- Le résidu restant est trituré plusieurs fois avec de l'éther, décanté. Il est séché sous vide en présence de KOH. Ce résidu est dissout dans la diméthylformamide (10 mL) en présence de Z-Lys(Boc)-OH, (3,81 g, 10
25 mmoles), BOP (4.42 g, 10 mmoles), de la diisopropyléthylamine (DIEA, 22 mmoles).

Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0° C, puis 4 heures à la température ambiante.

- Le solvant de la réaction est évaporé sous vide à une température
30 inférieure à 40° C.

Le résidu est dissout dans de l'acétate d'éthyle (200 mL).

La phase organique est lavée plusieurs fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL), avec une solution saturée de KHSO₄ (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide pour
5 conduire à une mousse blanche (4.7 g, 82%) homogène en chromatographie sur gel de silice.

Z-Lys-(Boc)-Lys-(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂

10 Le composé ZLys(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂ (5.7 g, 10 mmoles) est dissout dans l'éthanol 95 (150 mL) contenant 10 mmoles d'acide chlorhydrique.

Le mélange réactionnel est hydrogéné pendant 5 heures.

15 Le catalyseur est filtré et le solvant concentré sous vide à une température inférieure à 40° C.

Le résidu restant est trituré plusieurs fois avec de l'éther, décanté. Il est séché sous vide en présence de KOH. Ce résidu est dissout dans la diméthylformamide (10 mL) en présence de Z-Lys(Boc)-OH, (3,81 g, 10 mmoles), BOP (4.42 g, 10 mmoles), de la diisopropyléthylamine (DIEA, 22
20 mmoles).

Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0° C, puis 6 heures à la température ambiante.

Le solvant de la réaction est évaporé sous vide à une température inférieure à 40° C.

25 Le résidu est dissout dans de l'acétate d'éthyle (300 mL).

La phase organique est lavée plusieurs fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL), avec une solution saturée de KHSO₄ (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide pour
30 conduire à une mousse blanche (6.5 g, 81%) homogène en chromatographie sur gel de silice.

A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

Le composé ZLys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂ (8 g, 10 mmoles) est dissout dans l'éthanol 95 (200 mL) contenant 20 mmoles d'acide chlorhydrique.

Le mélange réactionnel est hydrogéné pendant 5 heures.

5 Le catalyseur est filtré et le solvant concentré sous vide à une température inférieure à 40° C.

Le résidu restant est trituré plusieurs fois avec de l'éther décanté. Il est séché sous vide en présence de KOH. Ce résidu est dissout dans la diméthylformamide (10 mL) en présence d'acide adipique (2.1 g, 10
10 mmoles), BOP (4.42 g, 10 mmoles), de la diisopropyléthylamine (DIEA, 22 mmoles).

Le mélange réactionnel est agité 15 min à 0° C, puis 5 heures à la température ambiante.

15 Le solvant de la réaction est évaporé sous vide à une température inférieure à 40° C.

Le résidu est dissout dans de l'acétate d'éthyle (200 mL).

La phase organique est lavée plusieurs fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL), avec une solution saturée de KHSO₄ (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL). La phase
20 organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide pour conduire à une poudre blanche (7.5 g, 76%) homogène en chromatographie sur gel de silice.

Ce composé est dissout dans l'acide trifluoroacétique (50 mL).

Après 30 min, le solvant est concentré sous vide à une température
25 inférieure à 40° C et le résidu trituré plusieurs fois avec de l'éther anhydre.

La poudre blanche obtenue (6.9 g, 88%) est séchée sous vide.

Adipoyl-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

Exemple n° 2 - Synthèse du conjugué 8

A-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

A = Trans-10-Hydroxy-déc2-énoïc-acide

5

La synthèse a été réalisée par la méthode de Merrifield adaptée selon les étapes suivantes et la méthodologie décrite à l'exemple n°1 :

- 1 - Z-Gly-OH + H-His-Lys-NH₂
- 10 2 - Z-Gly-His-Lys-NH₂
- 3 - Z-Lys-(BOC)-Gly-His-Lys-NH₂
- 4 - A-BOP, DIEA, DMF
- 5 - Decenoyl-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

15

Préparation du complexe métallo-peptidique avec le Zinc.

On utilise le sel de Zinc sous forme de ZnCl₂.

Le conjugué peptidique précédemment obtenu est mis en solution à pH.56 dans l'eau distillée dans les proportions suivantes :

1 molécule du conjugué n° 8 dans une solution de ZnCl₂ à 10%.

20

Après chauffage à 20° C pendant 10 mn, le complexe est purifié sur colonne de Biogel P-2 pour éliminer l'excès de chlorure de Zinc non fixé sur le peptide, et élué avec de l'eau distillée.

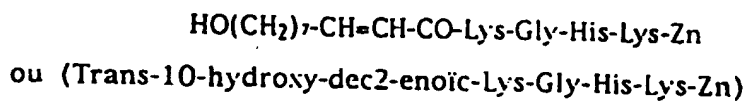
Après élution, on obtient une solution contenant 0,5% ce ZnCl₂ pour une molécule peptidique.

25

La solution est ensuite congelée à basse température "-60° C" et lyophilisée.

On obtient le complexe métallo-peptidique sous forme de poudre blanche dont la formule est la suivante :

30



dont les caractères analytiques sont les suivants :

Caractères organoleptiques : Lyophilisat blanc soluble dans l'eau.

5

Pureté HPLC : 95%.

Spectrométrie de masse "hors Zinc" PM 636.4-6363.6

10 Composition en acides aminés
(% hors Zinc)

Lysine 42.95%

Histidine 21,55%

Glycine 8,97%

15

Exemple 3 - Etude du pouvoir cicatrisant du conjugué peptidique n° 7 chez l'animal "rat"

But de l'étude

20

Déterminer le pouvoir cicatrisant du peptide n° 7 administré chez le rat-OFA par applications topiques aux doses de 0,75 µg, 7,5 µg et 75 µg par animal pendant cinq jours.

25 **Matériel et méthode**

I - Animaux : rats de souche OFA, OF1, IFFA-CREDO, pesant de 250 à 300 g.

II - Produits à tester

30

Conjugué peptidique n° 7, correspondant la formule :
Adipoyl-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂.

Mis en solution dans le propylène glycol aux doses de 1,5 µg/ml, 15 µg/ml, 150 µg/ml.

III - Méthode

5

Après anesthésie générale à l'éther, une incision de 5 cm de long a été pratiquée sur la flanc droit des animaux.

Une suture en fil trinyl 2/0 a été effectuée à raison d'un point tous les 0,5 cm.

10

Les animaux traités comme les témoins ont subi la même intervention dans les mêmes conditions.

Le traitement a débuté le lendemain de l'intervention sur les lots d'animaux traités aux doses de 0,5 ml de solution peptidique sur chaque incision.

15

Soit 0,75 µg, 7,5 µg et 75 µg de peptide par animal et par application pendant la durée du traitement, soit 5 jours.

Les animaux ont été mis en observation pendant 9 jours, ils ont ensuite été sacrifiés par une dose létale de penthiobarbital.

20

Les zones de peau en cours de cicatrisation ont été prélevées et soumises aux "tests" d'étirement au dynamomètre, pour mesurer la résistance de la cicatrice à l'étirement.

Analyse statistique des résultats

25

Une analyse statistique a été effectuée sur les valeurs de résistance obtenue au dynamomètre.

Une analyse de variance et un test de "T" student a été pratiqué sur les valeurs individuelles, afin de définir le seuil de signification des résultats.

30

Résultats

Le peptide n°7, administré aux doses de 0,75 µg, 7,5 µg et 75 µg, par jour et pendant 5 jours consécutifs, aux animaux en expérimentation, augmente de façon hautement significative, la cicatrisation des plaies chez

les animaux traités par rapport aux témoins, aux doses de :

0,75 μ g l'augmentation est de 14,5%,

7,5 μ g l'augmentation est de 30,9%,

75 μ g l'augmentation est de 59,6%.

- 5 On observe en particulier une cicatrisation totale chez les animaux traités, à partir du 3ème jour, alors que les témoins ne présentent pas de signe visible de cicatrisation.

- 10 L'aspect des cicatrisations au 9ème jour présente chez les animaux traités, une cicatrisation parfaitement plate, avec absence de bourrelets cicatriciels.

Tableau n° 1

- 15 Animaux traités par 0,75 μ g/jour/5 jours par peptide formule n° 7

Résistance des cicatrices à l'étirement "dynamométrie"

20	Groupe Témoin		Groupe Traité	
	Animaux	Dynes	Animaux	Dynes
25	894923	26,2	894918	28,5
	894924	23,7	894919	26,1
	894925	22,5	894920	29,3
	894926	25,4	894921	27,7
	894927	24,8	894922	28,6
	Moyenne	24,5 +/- 1,5	Moyenne	28,0 +/- 1,2

Tableau n° 2

5 Animaux traités par 7,5 µg/jour/5 jours par peptide formule n° 7

10	Groupe Témoin		Groupe Traité	
	Animaux	Dynes	Animaux	Dynes
	894923	26,2	894928	32,6
	894924	23,7	894929	30,4
	894925	22,5	894930	33,1
	894926	25,4	894931	32,3
15	894927	24,8	894932	31,8
	Moyenne	24,5 +/- 1,5	Moyenne	32,0 +/- 1,0

Tableau n° 3

20

Animaux traités par 7,5 µg/jour/5 jours par peptide formule n° 7

25	Groupe Témoin		Groupe Traité	
	Animaux	Dynes	Animaux	Dynes
	894923	26,2	894933	39,8
30	894924	23,7	894934	41,3
	894925	22,5	894935	37,5
	894926	25,4	894936	36,2
	894927	24,8	894937	40,7
35	Moyenne	24,5 +/- 1,5	Moyenne	39,1 +/- 2,2

Conclusions

Les résultats obtenus au cours de cette étude permettent de conclure
5 que le peptide n° 7 possède une action cicatrisante hautement significative.

Pour les doses de 75 µg par jour pendant 5 jours la différence entre le groupe traité et le groupe témoin est de 59,6%.

10 Exemple 4 - Mise en évidence de l'activité du conjugué n° 7 sur la synthèse de collagène de type I par des fibroblastes en culture

La mise en évidence de l'influence du conjugué n° 7 sur la synthèse
15 de collagène de type I par des cellules en culture a été réalisée sur deux types cellulaires :

- des fibroblastes humains de plastron mammaire au 3ème passage, obtenus dans notre laboratoire de culture cellulaire à l'IEB,
- des MRC5, fibroblastes de poumon embryonnaire humain non
20 transformés au passage p38, obtenus à p 25-30 chez ICN FLOW.

Les cellules sont stimulées ou non avec le conjugué n° 7, puis elles sont observées au microscope photonique à fluorescence après révélation du collagène de type I par une réaction d'immuno-fluorescence
25 secondaire.

Matériel et méthode

Culture cellulaire :

30 Les cellules sontensemencées à raison de 70 000 cellules par ml pour les fibroblastes de primoculture et 20 000 pour les MRC5.

La culture est réalisée en DMEM 10% SVF dans les tubes de Leighton contenant une lamelle dans le fond du tube, volume final : 1,6 ml.

8 tubes sont prévus par type cellulaire : 3 témoins et 5 concentrations.

5

Préparation des produits :

Préparation d'une solution mère du conjugué n° 7 à $2,34 \cdot 10^{-3}$ M : M1

10	M	Vol de M	Vol de PBS-BSA	Vol M
	M2	2 ml M1	2,68 ml	10^{-3} M
15	M3	0,01 ml M2	1 ml	10^{-5} M
	M4	0,01 ml M3	1 ml	10^{-7} M
20	M5	0,01 ml M4	1 ml	10^{-9} M

Ces différentes solutions mères seront ajoutées au milieu de culture au moment du contact produit.

Les dilutions sont réalisées dans du PBS (Eurobio) - BSA 0,1% (Flucka) puis filtrées sur filtres $0,22 \mu\text{m}$ (Sartorius).

25

Méthodologie

A J0, le milieu est éliminé et remplacé par du milieu frais auquel est ajouté le conjugué n° 7 aux différentes concentrations selon le tableau suivant :

30

	C	Concentration finale	Vol milieu	Vol M
5				
	C1	10^{-4} M	1,5 ml	0,15 ml M2
	C2	10^{-5} M	1,5 ml	0,015 ml M2
10	C3	10^{-7} M	1,5 ml	0,015 ml M3
	C4	10^{-9} M	1,5 ml	0,015 ml M4
	C5	10^{-7} M	1,5 ml	0,015 ml M5
15				

Les témoins T0 et T ne reçoivent que du milieu.

T1 est traité comme C1.

20 Fixation des cellules

Le milieu est éliminé ; les tubes sont rincés 3 fois avec du DMEM sans sérum à 37° C.

Les cellules sont fixées 20 mn à 4°C en présence de PFA 2,5% (Prolabo) dans du Hanks (Eurobio).

25 3 rinçages en DMEM sans sérum sont effectués suivis de 2 lavages 10 mn en PBS sans calcium ni magnésium (Eurobio).

Marquage des cellules

30

* Réaction primaire : fixation du premier anticorps de souris anticollagène humain de type I dilué au 1/100ème dans du PBS.

Les lamelles sont sorties des tubes et séchées. La face portant les cellules est repérée et signalée (un angle est cassé pour repère).

100 ml d'anticorps primaire sont mis au contact des cellules pour les conditions C1 à C5.

- 5 Les lamelles T et T1 restent dans les tubes avec du PBS sans calcium ni magnésium car ce sont des témoins pour le deuxième anticorps.

Les lamelles sont placées en chambre humide pour éviter la déshydratation à +4° C sous agitation douce durant toute la nuit.

- 10 * Réaction secondaire : cette étape révèle la réaction primaire par un anticorps secondaire de chèvre anti-Ig G de souris marqué TRITC : Sigma réf. T-7782 lot 044H4831.

L'anticorps primaire est éliminé et les lamelles sont lavées 2 fois au PBS pendant 10 mn à température ambiante.

- 15 Puis un lavage en PBS 0,1% BSA est réalisé 10 mn supplémentaires.

100 ml d'anticorps secondaire dilué au 1/120ème sont mis au contact des cellules de toutes les lamelles à température ambiante durant 1 heure.

L'anticorps est ensuite éliminé et les lamelles sont lavées au PBS 0,1% BSA 10 mn, puis 4 fois 5 mn à l'eau osmosée.

- 20 Une fois séchées les lamelles sont montées côté cellules sur une lame de microscopie contre une goutte de liquide de montage (Sigma). Les bords des lamelles sont lutés au vernis.

Résultats

- 25 Les observations microscopiques sont réalisées sur un microscope droit à fluorescence Zeiss (Axioplan), surmonté d'une caméra 3 CCD Sony (MC-3215 P/M) reliée à un moniteur vidéo Trinitron avec écran couleur Sony. L'ensemble est connecté à une imprimante couleur Sony (UP-7000p).
- 30 Les observations des lames sont faites avec l'objectif Plan Apochromat x 63 à l'huile.

Les cellules sont d'abord observées en contraste interférentiel et/ou de phase. Quand un champ est sélectionné, l'image est enregistrée, puis sans bouger d'endroit l'observation est réalisée en fluorescence et enregistrée.

- 5 Ainsi pour chaque prise de vue nous disposons simultanément à l'écran ou superposées les 2 images mémorisées.

Conclusions

- 10 Comme le montre l'ensemble de ces résultats, le conjugué n° 7 à 10-11 M stimule très significativement la synthèse de collagène de type I par des fibroblastes de primoculture.

- 15 La couleur rouge indique la fixation des anticorps secondaires marqués à la rhodamine sur les anticorps anti-collagène de type I. Cette couleur témoigne donc de la présence de collagène de type I synthétisée par les fibroblastes en culture.

- 20 La luminosité moyenne du rouge sur l'ensemble de l'image des cellules traitées avec le conjugué n° 7 à 10-11 M est de 54,8 alors que pour les cellules non traitées elle n'est que de 32,78.

- 20 Le conjugué n° 7 stimule la synthèse de collagène de type I par les fibroblastes humains de primocultures de manière significative : +67%.

Les résultats non présentés ici, obtenus sur les MRC5 donnent les mêmes tendances.

- 25 (Voir figures 1 à 3).

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 :

30

Intensité de fluorescence de fibroblastes marqués à la rhodamine : mise en évidence du collagène de type I

■ 10-11 M

35

■ 10-9 M

■ 10-7 M

■ T

REVENDICATIONS

1. Conjugué peptidique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'au moins 3 acides aminés choisis parmi Lys-Lys-Gly, Gly-His-Lys et Glu-His-Lys,
- 5 dans laquelle "Lys" représente la Lysine ou un dérivé halogéné de la Lysine, ou un dérivé méthylé de la Lysine, notamment Méthyl-Lysine et Dihydrobromo-Méthyl-Lysine, les acides aminés pouvant être sous la forme D, L ou DL,
- 10 ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi
- les acides monocarboxyliques de formule générale
- $$\text{HOOC-R} \quad (I)$$
- dans laquelle R représente un radical aliphatique en C₁-C₂₀, linéaire ou
- 15 ramifié, éventuellement substitué, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations,
- ainsi que les dérivés alcool ou aldéhyde ou amide des acides de formule I ;
- à la condition que si la séquence peptidique comprend uniquement Gly-His-Lys, elle n'est pas conjuguée à un seul résidu d'acide palmitique ;
- 20 - les acides dicarboxyliques de formule générale
- $$\text{HOOC-R}_1\text{-COOH} \quad (II)$$
- dans laquelle R₁ représente un radical aliphatique divalent, comprenant au moins 3 atomes de carbone, de préférence 3 à 10 atomes de carbone, droit ou ramifié, notamment un radical alkyl, alkylène, alkénylène ou
- 25 alkynylène, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino, hydroxy, oxo ou un radical alkyl en C₁-C₃.

2. Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce que dans la
- 30 formule générale I, R peut représenter :

- un radical monoinsaturé de configuration cis ou trans, de formule générale

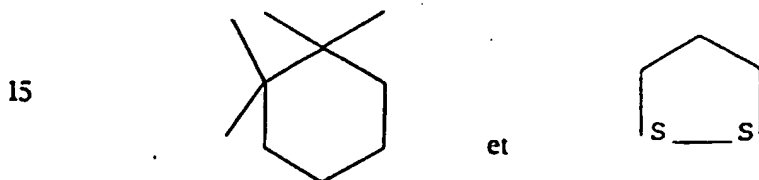


- dans laquelle R₂ peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié
- 35 comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence 6 à 16 atomes de carbone éventuellement, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo ;

- un radical aliphatique linéaire ou ramifié en C_1 - C_{20} substitué ou non, notamment un radical alkyl, alkényl ou alkynyl pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux choisis dans le groupe comprenant :

- 5 NH_2 , OH, oxo, thiol ou un radical cyclique non aromatique comportant de 5 à 6 atomes dans le cycle dont 1 ou 2 pouvant être différents du carbone, en particulier, S, O ou N, lesdits cycles pouvant être substitués par des radicaux alkyl en C_1 à C_3 , notamment méthyl.

- 10 3. Conjugué selon la revendication 2, caractérisé en ce que lorsque R représente une chaîne aliphatique en C_1 - C_{20} , elle peut être substituée par un cycle choisi parmi



- 20 4. Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce que dans la formule II, R_1 représente un reste alkylène en C_4 - C_8 éventuellement substitué.

- 25 5. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence d'acides aminés est liée à l'acide de formule I ou II ou à son dérivé sous forme de sel, d'ester ou d'amide.

- 30 6. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que l'acide de formule générale I est choisi parmi l'acide acétique, l'acide DL lipoïque, l'acide dihydrolipoïque, la N-lypoyl-lysine, les acides hydroxydécénoïques et décénoïques, l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol et le rétinol, l'acide myristique et ses dérivés, l'acide palmitique, sous forme de sels, d'esters ou amides, et en ce que l'acide de formule générale II est choisi parmi l'acide adipique, l'acide α -amino adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et leurs dérivés.

7. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide α -DL-Lipoïque et ses dérivés,
5 l'acide dihydrolipoïque, la N-Lipoyl-Lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et ses dérivés, l'acide trans-10-hydroxy- Δ^2 -décénoïque et l'acide trans-oxo-9-decène-2-oïque, l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol, et le rétinol, l'acide myristique et l'acide palmitique.

10

8. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il présente la formule générale

A-X-Gly-His-Lys-Y (III), ou

A-X-Glu-His-Lys-Y (IV)

15 dans laquelle . A est un composé de formule générale I ou II, ou le radical correspondant

. X peut représenter une chaîne de 1 à 3 résidus Lys, éventuellement méthylés, OH, NH₂ ou une liaison

. Y peut représenter OH ou NH₂.

20 les acides aminés étant sous forme D, L ou DL

9. Conjugué selon l'une des revendications de 1 à 8 caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les dérivés peptidiques suivants :

25 1 - A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

2 - A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

3 - A-MeLys-Gly-His-Lys-NH₂

4 - A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH

5 - A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-OH

30 6 - A-MeLys-Gly-His-Lys-OH

7 - A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

- 8 - A-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 9 - A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 10 - A-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 11 - A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-NH₂
- 5 12 - A-Lys-Glu-His-Lys-NH₂
- 13 - A-Glu-His-Lys-NH₂
- 14 - A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 15 - A-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 16 - A-Glu-His-Lys-OH

10

"A" étant un acide de formule générale I ou II telles que définies dans les revendications de 1 à 7, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels d'esters ou d'amides.

- 15 10. Conjugué selon l'une des revendications de 1 à 9, caractérisé en ce qu'il est sous forme de complexes métallopeptidiques liés physiquement ou chimiquement à un sel de Zinc.

- 20 11. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un conjugué selon l'une des revendications 1 à 10 avec des excipients pharmaceutiquement acceptables.

- 25 12. Composition galénique pharmaceutique, comprenant au moins un des conjugués peptidiques selon l'une des revendications 1 à 10, présentées sous forme de pommades, de crèmes dermiques, de gels, de lotions et de sprays, destinés à la médecine humaine et vétérinaire pour le traitement et la cicatrisation des plaies.

13. Composition galénique pharmaceutique, comprenant au moins un conjugué peptidique, selon l'une des revendications de 1 à 10, caractérisée en ce que le conjugué est associé à au moins une substance choisie parmi les antiseptiques, les antibiotiques à large spectre antimicrobien, ou les antifongiques à large spectre d'activité, destinée au traitement par voie topique et à la cicatrisation des plaies infectées.

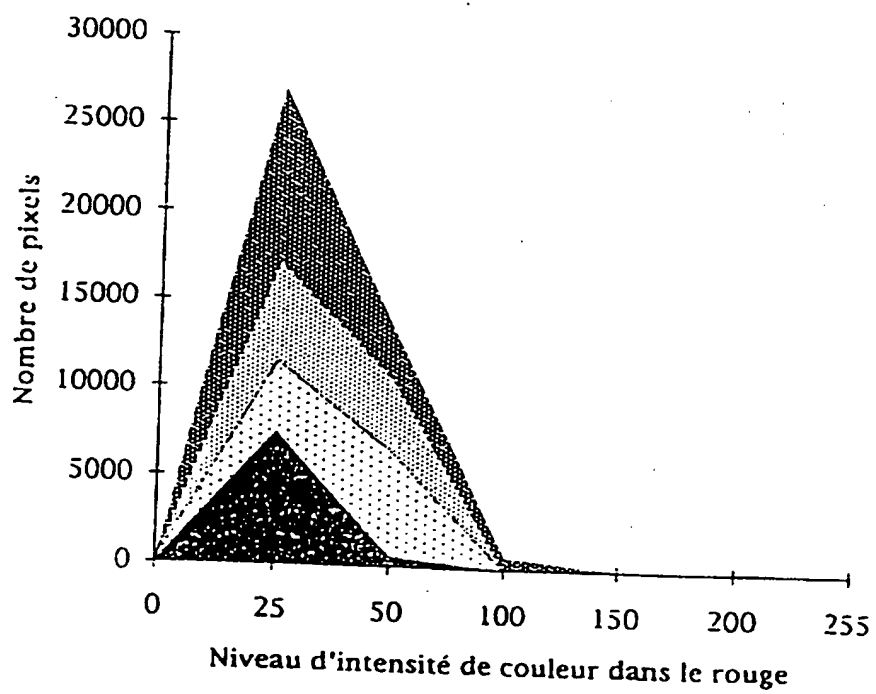
14. Composition galénique à usage pharmaceutique et cosmétologique, comprenant au moins un des conjugués peptidiques selon les revendications de 1 à 10, présenté sous forme d'associations ou de composés, avec des molécules connues pour leurs activités anticoagulantes et phlébotoniques par voie topique, destinées au traitement préventif et curatif, des vergetures, des insuffisances veineuses (jambes lourdes), de la couperose, en applications locales, sous forme de crèmes de gels, de laits ou de sprays.

15. Composition galénique à usages pharmaceutiques et cosmétologiques, comprenant au moins un des conjugués peptidiques selon les revendications de 1 à 10 utilisés seuls, ou sous forme d'associations, de composés, ou de complexes, avec des molécules connues pour leur dérivés homologues de l' α MSH, de l'ACTH; et de la proopiomélanocortine, présentées sous forme de crèmes, de gels, de laits, de lotions ou de sprays, pour applications topiques, et destinées au traitement préventif et curatif des troubles de la mélanogénèse, à l'accélération de la mélanisation de l'épiderme, et à l'obtention d'un bronzage cutané naturel, et d'une protection totale contre les radiations solaires ultra-violettes (UVA-UVB).

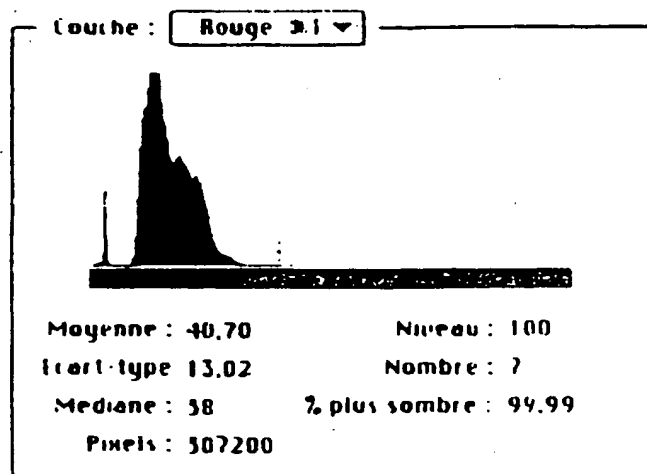
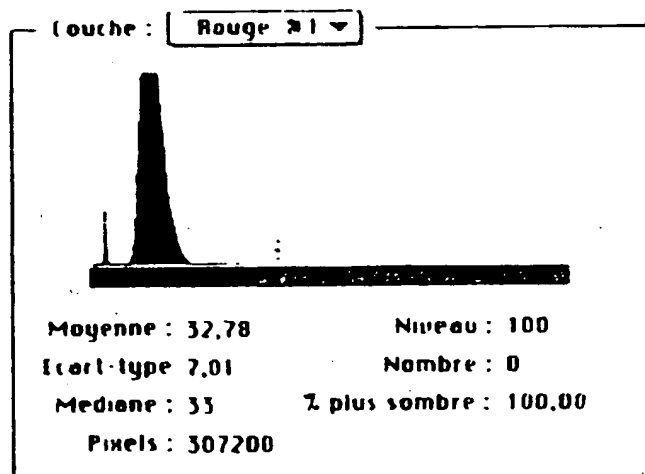
16. Conjugué peptidique selon l'une des revendications 1 à 10, pour son utilisation à titre de médicament.

17. Composition cosmétologique contenant au moins un conjugué selon l'une des revendications 1 à 10 présentées sous forme de crèmes, de gels, de lotions, ou de sprays, pour applications par voie topique destinées au traitement préventif et curatif des rides du visage, du cou et des mains.

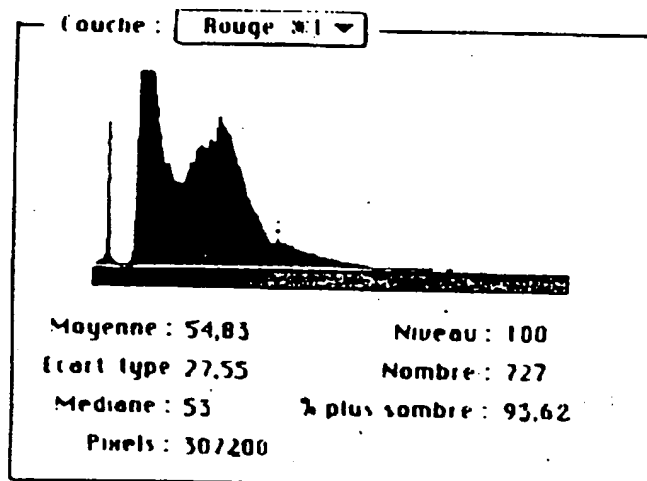
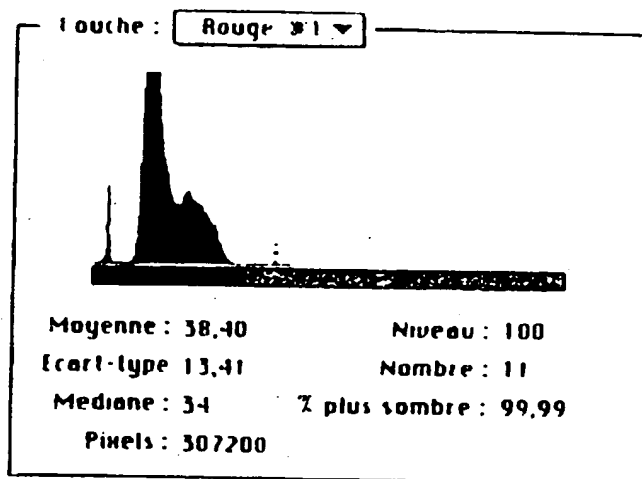
1 / 3

FIG.1

2/3

FIG. 2AFIG. 2B

3/3

FIG. 3AFIG. 3B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/01811

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K7/06 C07K5/08 C07K5/10 A61K38/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 12267 A (PROCYTE CORPORATION) 22 August 1991 see the whole document ---	1-17
A	WO 91 07431 A (PROCYTE CORPORATION) 30 May 1991 see the whole document ---	1-17
A	DE 41 27 790 A (A WANK) 25 February 1993 see the whole document -----	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 6 March 1997	Date of mailing of the international search report 25.03.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01811

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-3
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Due to the extremely broad scope of claims 1-3, which cover all sequences containing the tripeptides of claim 1, a complete search is not possible for reasons of economy.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01811

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9112267 A	22-08-91	US 5118665 A AU 7254491 A CA 2075705 A EP 0514460 A JP 5503939 T	02-06-92 03-09-91 10-08-91 25-11-92 24-06-93
WO 9107431 A	30-05-91	US 5120831 A AU 652136 B AU 6878191 A CA 2068324 A EP 0500745 A JP 5501567 T US 5550183 A	09-06-92 18-08-94 13-06-91 14-05-91 02-09-92 25-03-93 27-08-96
DE 4127790 A	25-02-93	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem^r Internationale No
PCT/FR 96/01811

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07K7/06 C07K5/08

C07K5/10 A61K38/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 91 12267 A (PROCYTE CORPORATION) 22 Août 1991 voir le document en entier ---	1-17
A	WO 91 07431 A (PROCYTE CORPORATION) 30 Mai 1991 voir le document en entier ---	1-17
A	DE 41 27 790 A (A WANK) 25 Février 1993 voir le document en entier -----	1-17

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 Mars 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25.03.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Masturzo, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°

PCT/FR 96/01811

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n° 1-3
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
A cause de l'énorme étendue des revendications 1-3, qui couvrent toute séquence contenant les tryptptides de la revendication 1, il s'est avéré qu'une recherche complète n'est pas possible pour des raisons d'économie.
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Demr Internationale No

PCT/FR 96/01811

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9112267 A	22-08-91	US 5118665 A	02-06-92
		AU 7254491 A	03-09-91
		CA 2075705 A	10-08-91
		EP 0514460 A	25-11-92
		JP 5503939 T	24-06-93

WO 9107431 A	30-05-91	US 5120831 A	09-06-92
		AU 652136 B	18-08-94
		AU 6878191 A	13-06-91
		CA 2068324 A	14-05-91
		EP 0500745 A	02-09-92
		JP 5501567 T	25-03-93
US 5550183 A	27-08-96		

DE 4127790 A	25-02-93	AUCUN	
